



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och  
husdjursvetenskap

**Tumör-associerade makrofagers  
inverkan vid juvertumörer hos  
hund**

**The influence of tumour-associated  
macrophages on mammary  
tumours in dogs**

*Martin Kläschen*

*Uppsala  
2019*



# **Tumör-associerade makrofagers inverkan vid juvertumörer hos hund**

## **The influence of tumour-associated macrophages on mammary tumours in dogs**

*Martin Kläschen*

**Handledare:** Magnus Åbrink, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)  
Caroline Fossum, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

**Examinator:** Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** Grundnivå, G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kursansvarig institution:** Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Kurskod:** EX0862

**Program/utbildning:** Veterinärprogrammet

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2019

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Tumör-associerade makrofager, TAM, makrofager, juvertumör, CMT, hund

**Key words:** Tumour-associated macrophages, TAM, macrophages, mammary tumour, CMT, canine



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning .....	3
Material och metoder .....	3
Litteraturoversikt.....	3
Makrofager.....	3
Tumörers mikromiljö .....	4
Kemotaxi .....	5
Angiogenes.....	6
Lymfangiogenes .....	7
Metastasering .....	7
Immunosuppression .....	7
Tumör-associerade makrofager.....	8
Hund som modelldjur för forskning på human bröstcancer.....	9
Diskussion .....	11
Litteraturförteckning .....	13



## SAMMANFATTNING

Tumör-associerade makrofager (TAM) är makrofager som under påverkan av tumörceller polariseras mot ett stadie där de frisätter tillväxtfaktorer, cytokiner, kemokiner och enzymer som främjar tumörtillväxt, kärlnybildning, invasion och metastasering. Det har konstaterats att ett högre antal TAM i juervävnad på hund är associerat med en sämre prognos jämfört med hundar med ett lägre antal TAM. I nästintill alla cancerformer är TAM antiinflammatoriska och dämpar immunsvaret vilket gör det möjligt för tumören att utvecklas till ett malignt tillstånd utan att bekämpas av kroppens immunförsvar. I den här litteraturstudien har jag undersökt hur TAM bidrar till malignitet och tumörtillväxt i juvertumörer hos hund. Eftersom juvertumörer på hund (CMT) och human bröstcancer (HBC) har nästintill identiska kliniska kännetecken ska jag också jämföra TAM roll i tumörutvecklingen vid CMT och HBC.

Makrofagen är en leukocyt som kan fagocytera patogener och cancerceller, uttrycka antigen på MHC II och genom produktion av lösliga faktorer sammanlänka det ospecifika medfödda immunförsvaret med det specifika förvärvade immunförsvaret. Makrofager har även en motsatt funktion och kan övergå till en fenotyp som läker vävnaden, tex efter en inflammationsskada. Denna fenotyp kallas för M2-makrofager och i juvertumörer på hund polariserar tumörcellerna makrofager mot denna fenotyp. Genom kemotaxi kan tumörceller få monocytter att extravasera ut i vävnaden där tumören är belägen. Inkommande monocytter utsätts för cytokiner och faktorer som får dem att differentiera till M2-likade makrofager. Makrofagerna som nu är tumör-associerade producerar och utsöndrar cytokiner, kemokiner och faktorer som attraherar ännu flera monocytter och förstärker tumörens signaler. Tumörceller och TAM verkar på många sätt ömsesidigt och förstärker varandras signaler för att optimera tumörtillväxten. Exempelvis utsöndrar de faktorer som inducerar nedbrytning av den extracellulära matrix som omger tumören vilket frigör utrymme för tillväxt men också alarminer kan utsöndras vilket bidrar till ytterligare inrekrytering av monocytter. TAM verkar dämpande på immunförsvaret genom utsöndring av immunosuppressiva ämnen som nedreglerar MHC II på antigenpresenterande celler (APC), hindrar T-lymfocyter från att differentiera ut till tumördödande cytotoxiska T-lymfocyter (CTL) och stimulerar bildningen av T-regulatoriska celler (Treg). TAM utsöndrar faktorer som inducerar angiogenes och lymfangiogenes vilket förser tumören med kärl som transporterar näringsämnen och syre till tumörcellerna och transporterar bort avfallsprodukter. Utöver detta fungerar dessa kärl som en transportväg för tumörceller som kan invadera kärlen och metastasera ut i kroppen. På många sätt bidrar alltså TAM till malignitet och tumörtillväxt i CMT. Tumörtillväxten och omvandlingen från benign till malign är på många sätt identiskt i HBC och CMT.

## SUMMARY

Tumour-associated macrophages (TAMs) are macrophages which, under the influence of tumour cells, are polarized towards a stage where they release growth factors, cytokines, chemokines, and enzymes that promote tumour growth, angiogenesis, invasion and metastasis. It has been discovered that a higher number of TAMs in mammary tissue in dogs is associated with a worse prognosis compared to dogs with a lower number of TAMs. In almost all cancers, TAMs are anti-inflammatory and suppresses the immune response, allowing the tumour to become malignant without being attacked by the immune system. In this literature study I have investigated how TAMs contribute to malignancy and tumour growth in canine mammary tumours. Since canine mammary tumours (CMT) and human breast cancer (HBC) have almost identical clinical characteristics, I will compare the role of TAMs in CMT and HBC carcinogenesis.

Macrophages are leukocytes that normally phagocytose pathogens and cancer cells, expresses antigen on MHC II and via production of soluble factors links the non-specific innate immunity to the specific acquired immunity. Macrophages, however, also have the opposite function. Macrophages can turn into a phenotype that heals tissue damaged by inflammation, so called M2 macrophages, a phenotype that tumour cells polarize macrophages into in canine mammary tumours. Chemotactic factors from tumour cells cause monocytes to extravasate into the tumour tissue where they differentiate into M2 like macrophages. The macrophages that now are tumor-associated produce and secrete cytokines, chemokines, and factors that attract even more monocytes and enhance the tumour signaling further. Tumour cells and TAMs act in many ways mutually and enhance each other's signals to optimize tumor growth. For example, factors inducing degradation of the extracellular matrix surrounding the tumour create space for growth but also the release of alarmins that further increase the chemotaxis of monocytes. TAMs act to suppress the immune system by secreting immunosuppressive agents that down-regulate MHC II on antigen-presenting cells (APC), preventing T lymphocytes from differentiating into tumour killing cytotoxic T-lymphocytes (CTL) and stimulating formation of T-regulatory cells (Treg). TAMs secrete factors inducing angiogenesis and lymphangiogenesis which provide the tumour with vessels that transport nutrients and oxygen to the tumour cells and remove waste products. In addition, these vessels act as a transport pathway for tumour cells that can invade these vessels and metastasize into distant sites in the body. In many ways TAMs contribute to malignancy and tumour growth in CMT. The tumour growth and conversion from benign to malignant are in many ways identical in HBC and CMT.



## INLEDNING

Human bröstcancer (HBC) är den vanligaste cancerdiagnosen som ställs och är den främsta orsaken till cancerrelaterad dödlighet bland kvinnor världen över (Abdelmegeed & Mohammed, 2018). Möss är ett frekvent använt modelldjur för HBC och det mesta vi idag vet om den cancerformen kommer från humanstudier och studier gjorda på gnagare (Carvalho *et al.*, 2016). Möss som modelldjur har dock flera tillkortakommanden och är inte alltid det optimala modelldjuret för HBC. Bland annat misslyckas vissa musmodeller *in vivo* att återskapa vissa mycket viktiga drag som observeras i HBC. På senare tid har hunden visats vara en mycket lovande djurmodell för human bröstcancerforskning. Juvertumörer på hund (CMT) och HBC har nästan identiska kliniska kännetecken, hunden har ett längre livsspann än möss och hundens genom är mer likt människans än musens (Uva *et al.*, 2009). Dessutom är CMT precis som HBC den vanligast förekommande cancerformen hos tikar och har ofta en dödlig utgång på grund av utvecklingen av metastaser (Beirão *et al.*, 2015). Syftet med denna litteraturstudie är att ta reda på vad TAM troligen bidrar med i tumörtillväxt och malignitet hos juvertumörer på hund samt jämföra fynden mellan människa och hund.

## MATERIAL OCH METODER

Vid litteraturstudien har jag använt databaserna Web of Science och PubMed. Sökorden var (TAM\* AND MACROPHAGES\*) AND (CANINE OR DOG).

## LITTERATURÖVERSIKT

### Makrofager

Makrofager är de mest plastiska cellerna i det hematopoetiska systemet och finns i alla vävnader. Makrofager uppvisar en stor funktionell diversitet och de har en viktig roll i upprätthållandet av homeostas, immunitet och vävnadsreparation (Lewis & Pollard, 2006).

Makrofager härrör från monocyter som produceras i benmärgen och cirkulerar i blodet innan de når sin målvävnad. I blodet, men framförallt i vävnaden, sker mycket komplexa interaktioner med cytokiner och tillväxtfaktorer vilket differentierar monocyt till en mogen makrofag. Det som avgör vilka egenskaper den mogna makrofagen uttrycker beror på profilen av de stimuli som präglade dess utmognad (Biswas & Mantovani, 2010). Dessa egenskaper kan variera i förmåga att fagocytera mikrober och restprodukter, uttrycka särskilda cellytereceptorer, förmåga att presentera antigen på MHC II och produktion av en stor mängd olika immunomodulerande cytokiner (Goerdts & Orfanos, 1999).

Eftersom makrofager kan differentieras till att ha många olika egenskaper har man för enkelhetens skull skapat en nomenklatur för att kunna dela in makrofager i två skilda grupper på varsin sida av ett spektrum. Vid ena polen återfinns "klassiskt aktiverade" M1-makrofager och vid motsatt pol finns "alternativt aktiverade" M2-makrofager. Den här uppdelningen härrör från *in vitro* experiment där omogna makrofager inkuberats med olika sorters stimuli. Det är dock mycket mer komplext *in vivo*, där makrofagpopulationen i en tumör mycket sällan är fullständigt homogen. M1/M2 dikotomin har sin fördel i att den generellt återspeglar den typ av T-hjälpar (Th) cellsvar som råder i kroppen (Mantovani *et al.*, 2004).

M1-makrofager bildas när naiva monocyter utsätts för Th1-cytokiner som exempelvis interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), tumörnekrosfaktor-alfa (TNF- $\alpha$ ) eller exponeras för lipopolysackarider (LPS). M1-makrofager driver på inflammationsprocesser genom att utsöndra proinflammatoriska cytokiner som TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 och IL-23. De producerar och utsöndrar höga nivåer av reaktiva syreradikaler (ROS), reaktiva kväveföreningar (RNS) och kväveoxidsyntas (iNOS) och främjar metabolism av arginin till kväveoxid och citrullin. Allt detta tillsammans med lågt pH skapar en fientlig miljö för patogener och tumörceller (Arango Duque & Descoteaux, 2014).

M2-makrofager är motsatsen till M1-makrofager. I *in vitro* försök polariseras omogna makrofager åt M2-fenotypen när de utsätts för bland annat IL-4 och IL-13. Båda dessa cytokiner inhiberar samtidigt polarisering mot M1-fenotypen. IL-4 och IL-13 produceras av Th2-celler och är involverade i vävnadsreparationen efter en infektion. TAM uttrycker i många cancerformer egenskaper som efterliknar egenskaperna hos en M2-makrofag. Exempelvis genom att inducera angiogenes och bryta ned arginin till ornitin och polyaminer vilket bidrar till vävnadstillväxt (Mosser, 2003). M2-makrofager rymmer fyra undergrupper, M2a, M2b, M2c och M2d. De skiljer sig åt i sina egenskaper och vilka stimuli de aktiveras av.

M2a: Aktiveras av IL-4 och IL-13

M2b: Aktiveras av immunkomplex, LPS, apoptotiska celler, IL-1Ra.

M2c: Aktiveras av IL-10, TGF- $\beta$  och glukokortikoider

M2d: Aktiveras av höga nivåer adenosin som bildas vid exempelvis ischemi och hypoxi (Ferrante *et al.*, 2013).

## **Tumörers mikromiljö**

Tumörens mikromiljö (TME) utgörs av de celler och strukturer som omger tumören. Detta innefattar både cellulära och icke-cellulära komponenter såsom immunceller, inflammatoriska celler, blodkärl, extracellulär matrix och signalsubstanser. Tumörceller kan producera och utsöndra signalsubstanser vilket skiftar immunceller till att bli tumörfrämjande. Dessa celler bidrar till immuntolerans och minskar chansen för kroppen att stöta bort tumören (Carvalho *et al.*, 2016).

Immunceller kan förse tumörens mikromiljö med tillväxtfaktorer, proangiogena faktorer, extracellulärt matrix-modifierande molekyler och immunosuppressiva cytokiner som främjar tumören. Vissa cytokiner som exempelvis transformerande tillväxtfaktor beta (TGF- $\beta$ ) har fler än bara en funktion och kan reglera många cellulära funktioner, som tillväxt och kemotaxi. TGF- $\beta$  är en potent dämpare av Th1- och Th2-celler och samverkar med många andra faktorer och ytreceptorer på immunceller för att verka immunhämmande (Travis & Sheppard, 2014).

Förändringar av de inflammatoriska komponenterna inom tumörens mikromiljö har en betydelsefull roll under karcinogenesen och forskare blir mer och mer medvetna om betydelsen av tumör-associerade immunceller och deras inverkan på tumörers utveckling (Carvalho *et al.*, 2016).

## Kemotaxi

Tumörceller kan utsöndra kemoattraktanter som får monocyter ute i blodbanan att extravasera till tumörvävnaden och differentiera (Hao *et al.*, 2012). Kemoattraktanter är ett begrepp som innehåller flera olika typer av signalsubstanter, bland annat cytokiner som vaskulär endotelcellstillväxtfaktor (VEGF), interleukin-10 (IL-10), kolonistimulerande faktor 1 (CSF-1) och TGF- $\beta$  (Mantovani *et al.*, 2004). En viktig grupp av cytokiner som är involverade i kemotaxin av makrofager är kemokiner. Det finns fyra grupper av kemokiner och de som har störst betydelse för makrofagers kemotaxi är CC-kemokiner som har fått sitt namn för att de har två intilliggande cystein-molekyler nära proteinets N-terminala del (Laing & Secombes, 2004).

En annan kemoattraktant för monocyter är alarminer, vilket är en grupp endogena molekyler som frisätts från nekrotiska celler eller utsöndras av stimulerade leukocyter. High mobility group box 1 (HMGB1) är en alarmin som finns i cellkärnan hos nästan alla däggdjur, däribland människan och hunden. Tumörceller och TAM har visats utsöndra stora mängder HMGB1 i flera olika humana cancerformer vilket bidrar till karcinogenes och metastasering av tumören då det ökar infiltratet av TAM inom tumören (Coffelt & Scandurro, 2008).

I juvertumörer hos hund har det observerats att tumören använder kemoattraktanter och cytokiner för att attrahera monocyter. Utöver detta omvandlas monocytorna till alternativt aktiverade makrofager. M2-makrofager producerar egna immunsuppressiva ämnen och inducerar bildandet av immunreglerande celler vilket leder till att tumören döljs för kroppens immunsystem. Tumören kan då växa obehindrat samt spridas och prognosen blir avsevärt sämre för hunden (Carvalho *et al.*, 2016).

Tumörceller kan producera och utsöndra IL-10 som stimulerar monocyter att omvandlas till M2-makrofager (Salazar-Onfray *et al.*, 2007). IL-10 är den viktigaste antiinflammatoriska cytokinen och dess huvuduppgift är att inhibera produktionen av IFN- $\gamma$ . Det leder till att makrofagernas fagocyterande förmåga hämmas, makrofagernas produktion av de proinflammatoriska cytokinerna TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  och IL-6 minskar samt att uttrycket av MHC II på makrofager minskar, vilket försämrar deras antigenpresenterande förmåga (Arango Duque & Descoteaux, 2014).

Vid ett försök med möss som saknade CSF-1 minskade inte incidensen eller tillväxten av tumörer. Transgena polyomavirus middle T-antigen (PyMT)-möss med ett överuttryck av CSF-1 hade en tätare kärlförsörjning till tumörer redan i ett premalignt stadie. Liknande kärlförsörjning har tidigare bara observerats i maligna tumörer hos icke CSF-1 transgena PyMT möss. Således drogs slutsatsen att CSF-1 inte påverkar incidensen eller tumörtillväxt, men leder till en ökning av makrofaginfiltrat som i sin tur leder till en ökad angiogenes. Detta antagande kunde styrkas med ytterligare ett försök i samma studie där makrofaginfiltratet i tumörer från mössen med ett överuttryck av CSF-1 jämfördes med makrofaginfiltratet hos kontroller. Mössen med överuttryck av CSF-1 hade en sexfaldig ökning av makrofaginfiltrat jämfört med kontrollgruppen. Ökningen av angiogenes möjliggör för tumören att utvecklas mot ett malignt tillstånd (Lin *et al.*, 2006).

## Angiogenes

En likhet mellan karcinogenesen hos CMT och HBC är en ökad nybildning av blodkärl till tumören. Maligna tumörer uttrycker högre nivåer av proangiogena faktorer som VEGF än sina benigna motsvarigheter och har avsevärt fler kärl samt prolifererande endotelceller (Sleeckx *et al.*, 2014).

Den mängd syre en tumör kan erhålla direkt från omgivningen kan bara syresätta den till en viss storlek (ca 2-3 mm<sup>3</sup>) innan den behöver bli vaskulariserad för att tillgodogöra sig den ökade efterfrågan på syre och näringsämnen som glukos och aminosyror (Benazzi *et al.*, 2014).

Blodkärlen kan inte nå in till alla områden i tumören och många solida tumörer har trots kärlförsörjning hypoxiska områden, vilket leder till en genetisk instabil miljö då många DNA-reparationsfunktioner nedregleras. Hypoxi leder också till att hypoxi-inducerad faktor 1 alfa (HIF1- $\alpha$ ) uppregleras och inducerar ännu mer angiogenes. TAM i både CMT och HBC uttrycker då faktorer som VEGF, tymidin-fosforylas och urokinas plasminogen aktivator (uPA) som svar på den syrefattiga mikromiljön i tumören (Coffelt *et al.*, 2009). Tymidin-fosforylas verkningsmekanism är ännu inte känd. Det har dock konstaterats i experiment på möss att kärlnybildningen avtog när en inhibitor till tymidin-fosforylas tillsattes i vävnaden. En trolig förklaring till hur tymidin-fosforylas främjar angiogenes är att den liknar platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) vilket stimulerar angiogenes i däggdjur (Miyadera *et al.*, 1995). Nybildade blodkärl i tumörer är oorganiserade och benägna att kollapsa, vilket resulterar i att områden i tumören blir utan blodtillförsel och hypoxi uppstår. Hypoxin attraherar TAM som utsöndrar proangiogena faktorer och cirkeln fortsätter. Resultatet blir en kraftigt förhöjd nybildning av blodkärl, förvisso omogna och inte fullt funktionella men det leder slutligen till att tumören får den ökade blodtillförseln den behöver (Lewis & Pollard, 2006).

Det har visats att den ökade graden av angiogenes är kopplad till TAM då experiment har gjorts på transgena möss som har en homozygot "noll" mutation på genen som transkriberar CSF-1 vilket inaktiverar genens funktion. CSF-1 är en viktig tillväxt- och överlevnadsfaktor för makrofager. När dessa möss utvecklade juvertumörer observerades ett märkbart lägre antal TAM i juvertumörerna och att det tog längre tid för tumören att bli malign och metastasera. Motsatta resultat erhöles i försök på transgena möss som hade ett övertryck av CSF-1 i juervävnaden där angiogenes och omvandlingen till malign cancer var kraftigt accelererad (Lin *et al.*, 2006).

Matrixmetalloproteinaser (MMP) är en familj zinkbindande enzymer som klyver komponenter i ECM. ECM är en fysisk barriär som hindrar tumörceller från att invadera omkringliggande vävnad men klyvning av komponenter i ECM kan tumörcellerna invadera omkringliggande vävnad. En annan mycket potent protumöregenskap är att vid klyvning av celler i ECM frisätts proangionena tillväxtfaktorer. Det har visats att inhibering av MMP-9 innan tumören har nått den s.k. "angiogena switchen" där proangiogena faktorer överväger de antioangiogena faktorerna, hindrar TAM från att uttrycka VEGF och kärlnybildningen minskar avsevärt (Xie & Murphy, 2019). MMP-9 uttrycks mycket mer i maligna tumörer jämfört med benigna tumörer och är förknippat med ett mer aggressivt beteende i CMT på grund av den ökade kärlnybildningen (Hirayama *et al.*, 2002).

## Lymfangiogenes

Tumörer och TAM kan utsöndra de lymfangiogeniska tillväxtfaktorerna VEGF-C och VEGF-D vilka aktiverar lymfkärlnybildning via VEGF receptor-3 (VEGFR3). Den höga nybildningen av blodkärl gör att dessa frekvent läcker ut vätska. Tack vare ökad nybildning av lymfkärl kan denna vätska med flera andra avfallsprodukter tas upp och transporteras bort tillbaka till blodet. Förekomsten av lymfkärl möjliggör en passage för tumören att metastasera till lymfknutor och vidare ut till andra organ (Schoppmann *et al.*, 2002).

## Metastasering

TAM-infiltrat i tumören resulterar som tidigare nämnt i produktion och utsöndring av proangiogeniska ämnen som konsekvens av hypoxi i TME. Även vid frånvaro av hypoxi kan tumören och TAM tillsammans via ömsesidig signalering inducera frisättning av proangiogeniska ämnen. Den höga koncentrationen av VEGF driver på kärltillväxt och vaskulär remodulering, som gör det möjligt för tumören att få ökad tillgång till syre och näringsämnen. Detta är nödvändigt för fortsatt tumörtillväxt då tumörceller har ett högt behov av näring och syre på grund av deras ohämmade celledelning. Blodkärlen som genomgår remodulering är väldigt porösa och ömtåliga, vilket underlättar för tumörceller att intravasera genom dessa och metastasera. I samband med utsöndring av ECM-remodulerande ämnen som MMP underlättar ett högt TAM-infiltrat metastasering av tumörceller (Green *et al.*, 2009).

## Immunosuppression

Förekomsten av immunceller i TME behöver inte tyda på en fientlig miljö för tumörcellerna. De huvudsakliga immuncellerna som verkar immunosuppressivt är regulatoriska T-celler, myeloid-derived suppressor cells (MDSC) och M2-makrofager (Wang *et al.*, 2017).

M2c-makrofager induceras av en kombination av IL-10, TGF- $\beta$  och glukokortikoider. I sin tur utsöndrar M2c-makrofager IL-10 och TGF- $\beta$ , två immunosuppressiva cytokiner som främjar utvecklingen av Th2-lymfocyter och Treg-celler samt inhiberar utvecklingen av cytotoxiska T lymfocyter (CTL) och natural killer (NK)-celler. M2c-makrofager utsöndrar stora mängder arginas som främjar vävnadsreparation och angiogenes. M2c-makrofagers förmåga att inducera Tregs ökar deras effektivitet i att skydda organ från skador orsakade av inflammation jämfört med M2a och M2b-makrofager (Arango Duque & Descoteaux, 2014). Cytokinbalansen som uppnås av höjda nivåer av VEGF, TGF- $\beta$ , IL-10 och minskade nivåer av IL-4, IL-12 och IFN- $\gamma$  dämpar mognaden av dendritiska celler. Mogna dendritiska celler är kända dämpare utav angiogenes medan omogna dendritiska celler främjar angiogenes (Carvalho *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

## Tumör-associerade makrofager

I normal frisk vävnad ska makrofager vara proinflammatoriska och fagocytera patogener och cancerceller. I många tumörer omvandlas makrofager till en antiinflammatorisk fenotyp. Denna grupp av makrofager inhiberar andra lymfocytens funktion genom frisättningen av inhibitoriska cytokiner och skapar en miljö som gynnar tumörtillväxt.

I många sorters cancer är ett högt antal av TAM i tumören associerat med en dålig prognos för överlevnad. Detta har man undersökt och bekräftat i studier av human magcancer, bröstcancer, urinvägscancer, äggstockscancer, oralcancer och sköldkörtelcancer (Zhang *et al.*, 2012). I motsats till detta fann man ett positivt samband mellan överlevnad och högt antal av TAM i kolorektalcancer på människa. I kolorektalcancer är TAM inflammatoriska och främjar ett Th1 svar (Lewis & Pollard, 2006).

TAM kan främja tumörtillväxt genom att verka kemotaktiskt för Tregs och genom att främja angiogenes och lymfoangiogenes via produktion av VEGF, VEGF-C och -D och TGF- $\beta$ . Det viktigaste är att TAM inducerar immunosuppression via frisättning av IL-10 och TGF- $\beta$ . Båda dessa cytokiner inhiberar utvecklingen av cytotoxiska T-celler och NK-celler och kan på så vis upprätthålla förekomsten av fler M2-liknande TAM i området kring tumören (Mantovani *et al.*, 2004).

I en studie av TAMs som isolerats från en transgen mouse mammary tumour virus (MMTV)-PyMT mus upptäcktes en ökad koncentration av den proinflammatoriska cytokinen macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ). Detta fynd kunde senare återskapas i *in vitro* studier på Met-1 celler, en tumörcellinje som härstammar från PyMT-möss. Detta visar hur TAM fortfarande bibehåller vissa proinflammatoriska funktioner och hur de inte kan ses som en homogen population av M1/M2-makrofager. Senare i studien jämfördes genuttrycket hos TAM från de transgena mössen med makrofager från mjälten tillhörande icke-transgena kullsyskon. Uttrycket av 460 gener skiljde sig åt mellan TAM och makrofagerna från mjälten. Många av generna som var uppreglerade i TAM styr funktioner som rör immunreglering, angiogenes, adhesion och sönderdelning av ECM (Ojalvo *et al.*, 2009).

I en annan studie där syftet var att definiera vilka celler som ingick i juvertumörer användes transgena MMTV-PyMT-möss. Myeloida celler utgjorde mer än 50% av de leukocyter som infiltrerat tumören. Dessa celler kunde delas upp i tre huvudgrupper (I, II och III), där morfologin och cellytereceptorna (MHC II, CD11b, Ly6C, Ly6G, CD11c, CD115 och F4/80) skiljde sig åt mellan grupperna. CD11b är en integrin som framförallt uttrycks på makrofager och monocyter, Ly6C uttrycks framförallt på monocyter, Ly6G är unikt för neutrofiler, CD11c är ett integrin som framförallt uttrycks på dendritiska celler, CD115 är receptorn för CSF-1 och F4/80 är en väl använd makrofagmarkör i gnagare. Grupperna II och III innehöll celler som uttryckte samma receptorer som inflammatoriska monocyter respektive neutrofiler. Grupp I uttryckte en blandning av DC- och makrofagmarkörerna MHC II, CD11c och F4/80. Vid jämförelse med en kontrollgrupp konfirmerades att cellerna i grupp I var TAM. I frisk juvervävnad från möss och andra däggdjur finns mammary tissue macrophages (MTM) som kan presentera antigen på MHC II, adherera och extravasera genom blodkärl ut i vävnad tack

vare CD11b. Vid tumörtillväxt hos MMTV-PyMT-mössen minskade proportionen av MTM och proportionen TAM ökade (Franklin *et al.*, 2014).

För att ta reda på om TAM härstammar från cirkulerande inflammatoriska monocyter som är CCR+ användes en korsning av PyMT/Ccr2<sup>-/-</sup> möss, där Ccr2<sup>-/-</sup> leder till en kraftig minskning av monocyteinfiltrat i tumören då de saknar CC-kemokinreceptorn. Vid 16 veckors ålder hade antalet MTM minskat vilket tyder på att MTM kontinuerligt ersätts med cirkulerande monocyter som differentierar till nya MTM. Andelen TAM i PyMT/Ccr2<sup>-/-</sup> mössen var inte avvikande från den i kontrolldjur, vilket visar att TAM har ett lägre behov av cirkulerande monocyter än MTM för att upprätthålla sin cellpopulation. I ett senare experiment i studien tömdes mössen på 96% av deras tumör-associerade monocyter. Detta uppnåddes genom att tillsätta diptheriatoxin till möss med en diptheriatoxinreceptor associerad till CCR2 lokuset, som kodar för receptorn till monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1/CCL-2). Genom denna strategi minskades mängden MTM och TAM avsevärt vilket tyder på att TAM härrör från cirkulerande monocyter, men behöver färre tillförda monocyter via blodet jämfört med MTM. En trolig anledning till detta kan vara att TAM uttrycker högre nivåer av Ki67 som är ett protein som uttrycks i G1-, S-, M- och G2 faserna av cellcykeln. Detta visar att TAM har högre proliferation jämfört med MTM (Franklin *et al.*, 2014).

En mängd olika signaler i makrofagernas omgivning påverkar ständigt deras polarisering. De blir aldrig terminalt differentierade, M2-makrofager som utsätts för Th1-cytokiner repolariseras till M1-makrofager (Zhang *et al.*, 2017).

## **Hund som modelldjur för forskning på human bröstcancer**

Gnagare är det mest frekvent använda modelldjuret inom cancerforskning men de har flera tillkortakommanden. För det första har möss, som oftast används inom cancerforskning, en för kort livstid för att kunna jämföra tumörutveckling med den observerad i HBC. Beroende på vilken musstam som användes kan livslängden variera. En normal livslängd för *Mus musculus* är ungefär 2 år, dock är den förväntade livslängden betydligt kortare för de transgena möss som utvecklar spontana juvertumörer. För det andra är 50% av HBC beroende av hormoner vid diagnos medan tumörer hos möss är oberoende av hormoner i majoriteten av fallen (Nandi *et al.*, 1995). Ett tredje argument är att de labbmöss som används som modell för HBC är inavlade stammar med MMTV-PyMT-sekvensen inkorporerat i genomet. I HBC är virus troligtvis inte den orsakade faktorn bakom cancerutvecklingen förutom möjligen som en kofaktor. Ett fjärde argument är att den cellulära mikromiljön skiljer sig åt mellan människa och gnagare. Gnagare konsumerar mer syre på cellnivå jämfört med större djur vilket resulterar i en distinkt cellulär mikromiljö som framförallt i avaskulära tumörer ger upphov till hypoxi och inducerar angiogenes på ett sätt som inte är representativt för processerna i HBC (Abdelmegeed & Mohammed, 2018). Hundar är mer utavlade och uppvisar en genetisk diversitet som speglar den vi ser hos människor, i motsats till detta är de flesta musstammarna som används inom juvertumörforskning inavlade stammar. Ytterligare en faktor som gör hunden till ett lämpat modelldjur inom bröstcancerforskning är att vi människor håller hund som husdjur och delar vår miljö med dem och utsätter dem för många av de karcinogener vi själva utsätts för (Uva *et al.*, 2009).

Hos kvinnor är den vanligaste spontant uppkomna elakartade cancerformen juverneoplasier, precis som hos tikar. Utvecklingen av tumören påverkas av östrogen; då icke-kastrerade tikar äldre än 2 år löper en 4-faldig risk att drabbas av tumörer jämfört med jämnåriga kastrerade tikar (Schneider, 1970).

I en studie analyserades prover från juvertumörer och normal juervävnad tagen från hund och människa. Vid jämförelse av uttrycket från ~10.000 ortologa gener, dvs. gener som är homologa till gener från en organism av en annan art, upptäcktes att många gener som överlappade mellan hund och människa var nedreglerade i juvertumörproverna. Med ett p-värde på  $<0.05$  kunde 717 gener identifieras vara nedreglerade i CMT proverna och av dessa överlappade 343 stycken med HBC proverna. (Uva *et al.*, 2009).



## DISKUSSION

Bland de spridda fenotyperna av makrofager finns det de som är länkade med en skyddande respektive patogen roll vid cancer. Den skyddande rollen verkställs av M1-makrofager som aktivt uttrycker tumördödande mekanismer och aktiverar kroppens immunförsvar för att effektivt bekämpa cancer. I motsats till detta dämpar TAM det adaptiva tumör-specifika immunsvaret och främjar tumörtillväxt, invasion, metastasering, ECM-remodellering och angiogenes (Beirão *et al.*, 2015). Vissa av dessa egenskaper är identiska med de egenskaper som M2-makrofager har i frisk vävnad i behov av reparation efter inflammatorisk skada. TAM är influerade av tumörproducerade cytokiner och omvandlas från redan existerande M1-makrofager men till störst del från cirkulerande monocyter som genom kemotaxi extravaserar till tumören i vävnaden (Ferrante *et al.*, 2013; Franklin *et al.*, 2014). Ute i vävnaden producerar och utsöndrar TAM i sin tur samma cytokiner som förstärker kemotaxin och differentieringen av monocyter till TAM. Många studier visar hur makrofager uppvisar genuttryck som kan främja angiogenes, gömma tumören från kroppens immunsystem och bistå tumören med cellulära processer som optimerar tumörtillväxt. Tumörcellerna ligger till störst del bakom regleringen av TAM men samspelet med övriga komponenter inom TME är en mycket viktig aspekt att ta i beaktande (Ojalvo *et al.*, 2009; Hao *et al.*, 2012).

Något som kom upp vid litteraturundersökningen och som förundrade mig var att TAM har en positiv verkan i ett fåtal cancerformer som exempelvis kolorektal men är associerad med en sämre prognos i de flesta andra former av cancer, som exempelvis juvertumörer. Är det tumörens ursprung som gör att uttrycket av cytokiner skiljer sig mellan cancerformerna vilket leder till att celltyper som makrofager har olika fenotyper och funktioner i dessa tumörer. Eller är det sammansättningen av cellulära och icke-cellulära komponenter i mikromiljön som förändrar makrofagfenotypen i de olika formerna av cancer. Som Lewis & Pollard, (2006) kom fram till är TAM inte en homogen population av celler. Variationen i TME är stor och med den variationen skiljer sig TAM i sina genuttryck och funktioner och skillnaderna hos TAM i olika TME är inte så välstuderade (Lewis & Pollard, 2006). Alltså vore det intressant att undersöka och finna specifika markörer och uttryck som skiljer sig åt mellan makrofager beroende på var i tumören de befinner sig och beroende på hur TME är i det området. På så sätt skulle en klarare bild av vilka stimuli som påverkar TAM fås fram samt skulle det bli lättare att placera in TAM på makrofagfenotypskalan.

I en studie med MMTV-PyMT-möss jämfördes genuttrycken i TAM och MTM för att finna flera skillnader (Franklin *et al.*, 2014). Vissa gener uttrycktes mer i MTM och det var exempelvis genen som transkriberar CD11b, vilket är väntat då CD11b som tidigare nämnt är en typisk M1-makrofagegenskap. Något oväntat var att TAM-populationen inte uttryckte flera typiska M2-makrofagmarkörer, istället var det MTM som uttryckte flera av dessa.

Juvertumörer hindrar kroppen från att omvandla eller nyskapa M1-makrofager genom att hämma frisättningen av Th-1 stimulerande cytokiner. Resterande M1-makrofager inom TME blir för det mesta repolariserade till M2-makrofager. Min uppfattning är att TAM till störst del är M2-makrofager med reservation för att M1-makrofager kan uppstå inom vissa områden i TME där signalsubstanter och förhållanden polariserar TAM mot M1-makrofag fenotypen.

Trots det bibehåller vissa M2-makrofager vissa egenskaper från sin tidigare M1-makrofag fenotyp.

På grund av makrofagers förmåga att repolariseras blir bilden av TAM och deras inverkan på karcinogenesen mycket mer komplicerad. Styrkan av stimuli som signalerar repolarisation är relevant för att avgöra hur karcinogenesen kommer fortgå. Alla individer är unika med sin egna sammansättning av immunceller, hälsostatus, ålder, genotyp m.m. Processerna bakom aktiveringen av makrofager är mycket komplexa och det finns också en otrolig diversitet inom TME och mellan olika cancerformer hos individer. Min åsikt är att makrofager fortfarande är ett forskningsområde inom immunologi där det finns kunskap kvar att hämta. Jag tror att M1- och M2-makrofag uppdelningen kommer fortsätta att användas i framtiden. Dock tror jag att folk kommer bli mer medvetna om makrofagers spektrum av egenskaper och att de kan byta fenotyper.

Efter den här studien kan jag konstatera att TAM på flera sätt bidrar till malignitet och utveckling av CMT. Jag tycker också att hund är ett mycket lämpligt modelldjur för HBC och jag är säker på att nya upptäckter komma göras som kommer till nytta i framställningen av effektiva behandlingsmetoder. Däremot tycker jag inte att möss ska sluta användas som modelldjur inom bröstcancerforskning, istället anser jag att möss ska kompletteras med hund som modelldjur i fall där musmodellen inte längre är optimal. Anledningen till att hunden är ett lämpligt modelldjur för human bröstcancerforskning är att juvertumörutvecklingen i hund har fler likheter med sjukdomsförloppet vid bröstcancer i människa jämfört med juvertumörutvecklingen i möss.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Abdelmegeed, S. M. & Mohammed, S. (2018). Canine mammary tumors as a model for human disease. *Oncology Letters*, 15(6), p 8195.
- Arango Duque, G. & Descoteaux, A. (2014). Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology* [online], 5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4188125/>. [Accessed 2019-02-18].
- Beirão, B. C. B., Raposo, T., Pang, L. Y. & Argyle, D. J. (2015). Canine mammary cancer cells direct macrophages toward an intermediate activation state between M1/M2. *BMC veterinary research*, 11, p 151.
- Benazzi, C., Al-Dissi, A., Chau, C. H., Figg, W. D., Sarli, G., de Oliveira, J. T. & Gärtner, F. (2014). Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology. *TheScientificWorldJournal*, 2014, p 919570.
- Biswas, S. K. & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, 11(10), pp 889–896.
- Carvalho, M. I., Silva-Carvalho, R., Pires, I., Prada, J., Bianchini, R., Jensen-Jarolim, E. & Queiroga, F. L. (2016). A Comparative Approach of Tumor-Associated Inflammation in Mammary Cancer between Humans and Dogs. *BioMed Research International*, 2016, p 4917387.
- Coffelt, S. B., Hughes, R. & Lewis, C. E. (2009). Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1796(1), pp 11–18 (Bone marrow-derived cells in tumor growth and metastasis).
- Coffelt, S. B. & Scandurro, A. B. (2008). Tumors Sound the Alarmin(s). *Cancer Research*, 68(16), pp 6482–6485.
- Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography.* - PubMed - NCBI. [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12443732?dopt=Abstract>. [Accessed 2019-02-21].
- Ferrante, C. J., Pinhal-Enfield, G., Elson, G., Cronstein, B. N., Hasko, G., Outram, S. & Leibovich, S. J. (2013). The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R $\alpha$ ) signaling. *Inflammation*, 36(4), pp 921–931.
- Franklin, R. A., Liao, W., Sarkar, A., Kim, M. V., Bivona, M. R., Liu, K., Pamer, E. G. & Li, M. O. (2014). The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6186), pp 921–925.
- Goerdts, S. & Orfanos, C. E. (1999). Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity*, 10(2), pp 137–142.
- Green, C. E., Liu, T., Montel, V., Hsiao, G., Lester, R. D., Subramaniam, S., Gonias, S. L. & Klemke, R. L. (2009). Chemoattractant Signaling between Tumor Cells and Macrophages Regulates Cancer Cell Migration, Metastasis and Neovascularization. *PLoS ONE* [online], 4(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2725301/>. [Accessed 2019-02-19].
- Hao, N.-B., Lü, M.-H., Fan, Y.-H., Cao, Y.-L., Zhang, Z.-R. & Yang, S.-M. (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, p 948098.
- Hirayama, K., Yokota, H., Onai, R., Kobayashi, T., Kumata, T., Kihara, K., Okamoto, M., Sako, T., Nakade, T., Izumisawa, Y. & Taniyama, H. (2002). Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. *Journal of Comparative Pathology*, 127(4), pp 249–256.

- Laing, K. J. & Secombes, C. J. (2004). Chemokines. *Developmental & Comparative Immunology*, 28(5), pp 443–460 (Cytokines- an evolutionary perspective).
- Lewis, C. E. & Pollard, J. W. (2006). Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Research*, 66(2), pp 605–612.
- Lin, E. Y., Li, J.-F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D. A., Qian, H., Xue, X. & Pollard, J. W. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Research*, 66(23), pp 11238–11246.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), pp 677–686.
- Miyadera, K., Sumizawa, T., Haraguchi, M., Yoshida, H., Konstanty, W., Yamada, Y. & Akiyama, S. (1995). Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Research*, 55(8), pp 1687–1690.
- Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(2), pp 209–212.
- Nandi, S., Guzman, R. C. & Yang, J. (1995). Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9), pp 3650–3657.
- Ojalvo, L. S., King, W., Cox, D. & Pollard, J. W. (2009). High-density gene expression analysis of tumor-associated macrophages from mouse mammary tumors. *The American Journal of Pathology*, 174(3), pp 1048–1064.
- Salazar-Onfray, F., López, M. N. & Mendoza-Naranjo, A. (2007). Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 18(1), pp 171–182 (Cytokines Coming of Age in South America).
- Schneider, R. (1970). Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*, 26(2), pp 419–426.
- Schoppmann, S. F., Birner, P., Stöckl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K. & Kerjaschki, D. (2002). Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *The American Journal of Pathology*, 161(3), pp 947–956.
- Sleeckx, N., Van Brantegem, L., Van den Eynden, G., Fransen, E., Casteleyn, C., Van Cruchten, S., Veldhuis Kroeze, E. & Van Ginneken, C. (2014). Angiogenesis in canine mammary tumours: a morphometric and prognostic study. *Journal of Comparative Pathology*, 150(2–3), pp 175–183.
- Travis, M. A. & Sheppard, D. (2014). TGF- $\beta$  activation and function in immunity. *Annual Review of Immunology*, 32, pp 51–82.
- Uva, P., Aurisicchio, L., Watters, J., Loboda, A., Kulkarni, A., Castle, J., Palombo, F., Viti, V., Mesiti, G., Zappulli, V., Marconato, L., Abramo, F., Ciliberto, G., Lahm, A., La Monica, N. & de Rinaldis, E. (2009). Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC genomics*, 10, p 135.
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., Li, X., Xiong, W., Li, G., Zeng, Z. & Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), pp 761–773.
- Xie, A. W. & Murphy, W. L. (2019). Engineered biomaterials to mitigate growth factor cost in cell biomanufacturing. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10, pp 1–10.
- Zhang, Q., Liu, L., Gong, C., Shi, H., Zeng, Y., Wang, X., Zhao, Y. & Wei, Y. (2012). Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophages in Solid Tumor: A Meta-Analysis of the Literature. *PLoS ONE* [online], 7(12). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3532403/>. [Accessed 2019-03-09].

Zhang, Y.-H., He, M., Wang, Y. & Liao, A.-H. (2017). Modulators of the Balance between M1 and M2 Macrophages during Pregnancy. *Frontiers in Immunology* [online], 8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5299000/>. [Accessed 2019-03-17].